动 物 学 研 究 2003, Feb. 24 (1): 35~38 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

研究报告

牛供体细胞的来源、血清饥饿和预激活对核移植卵体外胚胎发育的影响

李雪峰[1,2], 安志兴[2], 李 煜[2], 郭继彤[2], 李向臣[2], 张 涌[2]
(1. 华南师范大学 生命科学学院, 广东 广州 510631; 2. 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要: 牛皮肤成纤维细胞经血清饥饿或预激活处理后获得核胞体, 并注入去核卵母细胞内构建重组胚。检查重组胚 24 h 和 36 h 卵裂率以及 8 d 囊胚率, 以评估供体细胞及其处理方法对体细胞核移植效果的影响。实验结果表明: 来自 3 个年龄 (6、18 和 36 月龄)、2 个品系 (红安格斯肉牛和荷斯坦奶牛) 的 4 头供体牛皮肤细胞重组胚的卵裂率和囊胚率均无差异。生长到完全汇合的 36 月龄荷斯坦牛供体细胞血清饥饿 10~13 d 组重组胚的 36 h 卵裂率显著低于 0 d (对照)、3~5 d 和 6~9 d 组, 囊胚率显著低于 3~5 d 组; 经 5 μmol/L 离子霉素或 7%乙醇预激活 5 min 重组胚的卵裂率和囊胚率均与对照组无差异。

关键词: 牛; 体细胞核移植; 供体细胞; 血清饥饿; 预激活; 体外培养
中图分类号: S823.9; Q813.2; Q492.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2003)01-0035-04

Effects of Sources, Serum Starvation and Preactivation of Bovine Donor Cells on Development of Nuclear-transferred Embryos *in Vitro*

LI Xue-feng[1,2], AN Zhi-xin[2], LI Yu[2], GUO Ji-tong[2], LI Xiang-chen[2], ZHANG Yong[2]
(1. *College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou* 510631, *China*; 2. *College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shannxi* 712100, *China*)

Abstract: This study was designed to assess the effects of the sources of the donor cells and the treatments to the cells on the development of nuclear-transferred embryos *in vitro*. Fibroblast cells of bovines were or not treated with serum starvation or preactivation, and then nuclei were gained. Reconstructed embryos (RE) were produced by microinjecting the nuclei into the cytoplasm of enucleated oocytes, of which the cleavage rate (CR) was checked at 24 and 36 h, and the blastocyst rate (BR) on D8. The experiment resulted in: ①There was no difference in CR and BR of RE among three aged (6, 18 and 36 months) animals and two breeds (Angus and Holstein) for four individuals in total. ②CR of RE at 36 h, which produced with full-confluent fibroblast cells of 36-month Holstein experienced for 10-13 d serum-starvation duration, was lower than those for 0 d (control), 3-5 d and 6-9 d; BR of RE was only lower than that for 3-5 d. ③ CR and BR of RE, which produced from cells of 36-month Holstein, had no difference between the control and the preactivation by 5 μmol/L ionomycin or 7% ethanol.

Key words: Bovine; Somatic nuclear transfer; Donor cell; Serum starvation; Preactivation; *In vitro* culture

不同类型的供体细胞和供体细胞所处的不同细胞周期对核移植的结果有较大的影响 (Wilmut et al, 1997)。在成年动物体细胞核移植研究中, 由于供体细胞来源于染色体端粒已经变短的体细胞, 在克隆动物的同时也克隆了动物的年龄, 导致克隆动物出现早衰 (Shiels et al, 1999); 但后来的研究

收稿日期: 2002-09-11; 接受日期: 2002-12-09
基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目 (A2001AA213081)

表明染色体端粒的长度在核移植胚胎的发育过程中可恢复到正常水平（Betts et al，2001)。另外，供体动物的品种可能是影响核移植结果的原因之一，道赛特绵羊（Poll Dorset）的皮肤成纤维细胞构建的重组胚的发育能力明显高于苏格兰黑面羊（Scottlish Blackface）（Dinnyés et al，2000）。在体细胞核移植研究中，供体细胞 DNA 合成与细胞分裂间的协调性是影响核移植胚胎发育的重要因素。因此，多用血清饥饿法使细胞同步于细胞周期的 G_0/G_1 期，以提高核移植的效率。但不同的研究者采用不同的血清饥饿时间，对生长期的细胞一般血清饥饿时间在 7 d 左右（Zakhartchenko et al，1999；Dinnyés et al，2000）；也有人用长达 26 d 的供体细胞进行核移植；但研究发现，血清饥饿 11 d 以上将显著降低重组胚的囊胚发育率（Beyhan et al，2002)。由于处于 G_0/G_1 期的细胞代谢活动减弱，为了提高供体细胞与受体胞质的协调性，Lacham-Kaplan et al（1999）曾用离子载体激活供体细胞，发现经激活处理后构建的重组胚的卵裂率和囊胚发育率都显著高于未处理组。离子霉素（ionomycin）和乙醇与离子载体一样，常用于卵母细胞与核移植胚胎的激活（Li et al，2002；Zakhartchenko et al，1999)。

为探索供体牛年龄、品系，生长到完全汇合的供体细胞血清饥饿时间，以及离子霉素和乙醇预激活等对核移植胚胎的卵裂和发育的影响，我们用 3 个年龄、2 个品系的 4 头牛的皮肤成纤维细胞，以及 1 头牛的经血清饥饿或预激活处理的皮肤成纤维细胞作为供体，做了相关的核移植实验，以评估在体细胞核移植过程中供体细胞及其处理方法的优劣，为我国牛体细胞核移植研究提供一些借鉴。

1 材料和方法

1.1 受体卵母细胞的体外成熟培养与去核

牛卵母细胞体外成熟方法同 Li et al（1996）报道的方法。成熟培养 22～23 h 后，去除卵丘细胞，挑选明显具有第一极体的成熟卵母细胞，在含 5 μg/mL 细胞松弛素 B（CCB）的 PBS 内平衡 10 min，在 Nikon 倒置显微镜下用去核管吸出极体及附近部分细胞质连同中期Ⅱ染色体进行去核；然后在含 5 μg/mL Hoechst 33342 的培养液中培养 15 min，用 PBS 洗 2 次，荧光显微镜下检查去核情况。挑选完全去核的卵母细胞，在成熟培养液内继续培养 2 h 后用作体细胞核移植的受体胞质。

1.2 供体细胞的来源和处理

实验用皮肤成纤维细胞来自 4 头牛（A03 为 6 月龄红安格斯肉牛，来自西北农林科技大学科元生物工程有限公司牛场；A35 为 18 月龄红安格斯肉牛，来自加拿大国际新技术发展公司育生牛场；B144 和 B192 均为 36 月龄荷斯坦奶牛，来自西北农林科技大学奶牛场），经传代培养 2～10 代，并在上一代经染色体核型分析为正常二倍体核型，经下述处理后用作体细胞核移植的供体细胞。

1.2.1 不同供体　取 A03、A35、B144 和 B192 的皮肤成纤维细胞，在含 0.5% FBS 的 DMEM 液内血清饥饿培养约 5 d。

1.2.2 不同血清饥饿时间　B144 皮肤成纤维细胞生长到完全汇合后，在含 0.5% FBS 的 DMEM 液内分别血清饥饿培养 3～5 d、6～9 d 和 10～13 d；对照组血清饥饿 0 d。

1.2.3 离子霉素和乙醇预激活　B144 皮肤成纤维细胞血清饥饿约 5 d，分别用 5 μmol/L 离子霉素和 7% 乙醇激活 5 min；对照组不做预激活处理。

1.3 重组胚构建

采用山羊体细胞核移植方法（Guo et al，2002)，用 0.25% 胰蛋白酶消化经过处理的供体细胞，然后在含 0.5% FBS 的 DMEM 液内培养 1 h 以上，离心并用含 10% PVP（MW 360 kDa，Sigma）的 PBS 重悬细胞；在倒置显微镜下用直径略小于供体细胞直径的注射针（约 12 μm）反复抽吸供体细胞，使细胞膜破裂成为核胞体，通过显微操作将核胞体直接注射到受体的细胞质内构建重组胚。

1.4 重组胚的激活与体外培养

重组胚在培养液中培养 3.5～4 h，用 5 μmol/L 离子霉素激活 5 min，移入含 2 mmol/L 6-DMAP + 5 μg/mL CCB 的培养液内再激活 4 h。激活的重组胚用培养液洗 3 次，放入含 0.5 mL CR1aa 培养液的四孔培养板（Nunc）内培养，48 h 后加入 5% 发情第 7 天的牛血清。培养 24 h 和 36 h 时统计卵裂数，培养 7～8 d 统计发育的囊胚数。

1.5 实验结果统计

所有实验均重复 6 次以上，实验结果用 χ^2 进行统计分析。

2 结果

2.1 核供体动物对重组胚发育的影响

来自同一品种不同年龄个体、同品种同年龄和不同品种不同年龄的皮肤成纤维细胞所产生的重组胚，24 h 和 36 h 的卵裂率以及囊胚率均无显著差异（表 1）。

2.2 血清饥饿时间对重组胚发育的影响

3～5 d 血清饥饿组重组胚的 24 h 和 36 h 的卵裂率及囊胚率都显著高于 10～13 d 组，3～5 d、6～9 d 组与对照组无显著差异；10～13 d 组的重组胚在体外培养 36 h 的卵裂率显著低于其他各组，但囊胚率仅显著低于 3～5 d 组，与其他组无显著差异（表 2）。

2.3 预激活对重组胚发育的影响

经 5 μmol/L 离子霉素或 7% 乙醇预激活处理得到的重组胚，24 h 和 36 h 的卵裂率及囊胚率均与对照组无差异（表 3）。

表 1　核供体动物品种和年龄对重组胚发育的影响

Table 1　Effects of the breed and age of donor animals on the development of reconstructed embryos

供体动物 Donor animal*	供体动物月龄 Animal's month age	重组胚数 Reconstructed embryos	24 h 卵裂数 Cleavaged at 24 h [n (%)]	36 h 卵裂数 Cleavaged at 36 h [n (%)]	囊胚数 Blastocysts [n (%)]
A03	6	478	235 (49.2)	350 (73.2)	56 (11.7)
A35	18	289	139 (48.1)	209 (72.3)	30 (10.4)
B144	36	374	186 (49.7)	277 (74.1)	45 (12.0)
B192	36	320	145 (45.3)	217 (67.8)	31 (9.7)

* A：红安格斯肉牛（Angus）；B：荷斯坦奶牛（Holstein）。

表 2　供体细胞的血清饥饿时间对重组胚发育的影响*

Table 2　Effects of the serum-starvation durations of donor cells on the development of reconstructed embryos*

血清饥饿时间 Duration of serum starvation (d)	重组胚数 Reconstructed embryos	24 h 卵裂数 Cleavaged at 24 h [n (%)]	36 h 卵裂数 Cleavaged at 36 h [n (%)]	囊胚数 Blastocysts [n (%)]
0	320	145 $(45.3)^{b,c}$	217 $(67.8)^{d}$	36 $(11.3)^{f,g}$
3～5	355	195 $(54.9)^{a}$	249 $(70.1)^{d}$	45 $(12.7)^{f}$
6～9	598	307 $(51.3)^{a,b}$	425 $(71.1)^{d}$	64 $(10.7)^{f,g}$
10～13	496	202 $(40.7)^{c}$	272 $(54.8)^{e}$	42 $(8.5)^{g}$

* a,c 和 d,e：$P<0.01$；b,c 和 f,g：$P<0.05$。

表 3　供体细胞的预激活对重组胚发育的影响

Table 3　Effects of preactivation of donor cells on the development of reconstructed embryos

预激活方法 Preactivation method	重组胚数 Reconstructed embryos	24 h 卵裂数 Cleavaged at 24 h [n (%)]	36 h 卵裂数 Cleavaged at 36 h [n (%)]	囊胚数 Blastocysts [n (%)]
对照组 Control	320	145 (45.3)	217 (67.8)	36 (11.3)
离子霉素 Ionomycin	245	130 (53.1)	180 (73.5)	32 (13.1)
乙醇 Ethanol	178	87 (48.9)	117 (65.7)	19 (10.7)

3 讨　论

本研究用来自同品种不同年龄（A03 与 A35）和同品种同年龄（B144 与 B192）的 4 头供体牛的皮肤成纤维细胞进行核移植，发现由它们构建的重组胚的卵裂率和囊胚率相同。尽管 4 头牛年龄相差较小，不能充分证明供体年龄对体细胞核移植的影响，但可以证明来自不同品种、年龄相近的不同动物的皮肤细胞对核移植结果无影响。这显然与 Dinnyés et al（2000）在绵羊体细胞核移植研究中发现的不同供体动物的品种可能影响核移植的结果不同。由于细胞建系工作较复杂，本研究中所用的供体细胞均为未建系的皮肤成纤维细胞传代培养 2～10 代的细胞，无法比较来自同一品种不同年龄、不同品种不同年龄的不同细胞系对核移植胚胎卵裂和体外发育的影响，有关内容有待以后深入研究。

采用血清饥饿法使供体细胞停滞于细胞的 G_0/G_1 期可提高核移植的效率（Wilmut et al，1997）；不同的血清饥饿时间对核移植胚胎的发育影响不同。本研究表明，完全汇合的供体细胞在低浓度血清（0.5%）的培养液中培养 3～5 d 后用于核移植，重组胚的囊胚发育率略高于对照组但无明显差异。

这可能是因为完全汇合的供体细胞由于细胞接触抑制的作用，即使未经血清饥饿处理，位于 G_0/G_1 期的细胞仍占较高比例，因此尽管血清饥饿可提高 G_0/G_1 期细胞的比例，但对核移植结果不产生显著影响。Prather et al（1999）也曾发现，体外培养的猪乳腺上皮细胞在血清饥饿 5 d 后 G_0/G_1 期细胞的比例显著提高（85.8%），但当细胞生长到完全汇合时，G_0/G_1 期细胞的比例达到 85.6%，与血清饥饿 5 d 的无差异。因此，对于生长到完全汇合的细胞，短时间的血清饥饿只能略微提高核移植胚胎的卵裂率和囊胚率。

另外，本研究发现供体细胞在血清饥饿 10～13 d 后用于核移植，与血清饥饿 3～5 d 相比，不但未提高核移植胚胎的发育率，反而使囊胚率显著下降（8.5%比 12.7%）。表明长时间的血清饥饿将对供体细胞产生不利影响，这与 Beyhan et al（2002）的结论一致。这是因为长时间的血清饥饿，不但不会明显增加 G_0/G_1 期细胞的数量，反而会损伤细胞的 DNA，从而影响核移植胚胎的卵裂及进一步的发育（Kues et al，2000）。

由此可见，对完全汇合的细胞而言，在我们的体细胞核移植研究中，供体细胞的血清饥饿处理时间 3～5 d 优于 0、6～9 和 10～13 d。

影响核移植胚胎发育的一个重要因素是供体细胞 DNA 的合成与细胞分裂间的协调性。鉴于离子霉素和乙醇可以有效地激活牛卵母细胞（Li et al，2002），本研究尝试用它们预激活作为供体的成纤维细胞，以期改善上述协调性，但均未能提高重组胚的卵裂率和囊胚率。这一结果与 Lacham-Kaplan et al（1999）用离子载体预激活供体细胞、得到较高重组胚发育率的结果不同。造成这种差异的原因还有待进一步研究。

参考文献：

Beyhan Z, Mitalipova M, Chang TC, First N. 2002. Donor cell passage, starvation period and fusion-activation interval affect preimplantation development of bovine nuclear transfer embryos [J]. *Theriogenology*, **57**: 396.

Betts DH, Bordignon V, Hill JR, Winger Q, Westhusin ME, Smith LC, King WA. 2001. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98** (3): 1077－1082.

Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer [J]. *Biol. Reprod.*, **63** (2): 513－518.

Guo J, An Z, Li Y, Li XF, Li YQ, Guo ZK, Zhang Y. 2002. Cloned goats (*Capra hircus*) from adult ear cells [J]. *Sci. in China, Series C*, **45** (3): 260－267.

Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J, Niemann H. 2000. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: Effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors [J]. *Biol. Reprod.*, **62** (2): 412－419.

Lacham-Kaplan O, Diamente M, Trounson A. 1999. Pregnancy following injection of mechanically isolated fetal fibroblast nuclei into enucleated bovine oocytes [J]. *Theriogenology*, **51**: 206.

Li XF, Tan LL, Shi DS, Tan SJ. 1996. Effects of electric activation of the bovine nuclear transfer in the whole *in vitro* procedure [J]. *Acta Vetr. et Zootechnica Sinica*, **27**: 495－500. [李雪峰，谭丽玲，石德顺，谭世俭. 1996. 电激活对完全体外化牛细胞核移植的影响. 畜牧兽医学报, **27**: 495－500.]

Li XF, An ZX, Guo JT, Zhang Y. 2002. Effects of different chemical activations on the development of bovine parthenogenetic embryos [J]. *Journal of Northwest Sci-Tech University Agriculture and Forestry*, **30** (2): 43－47. [李雪峰，安志兴，郭继彤，张涌. 2002. 几种不同化学激活方法对牛卵母细胞孤雌激活的影响. 西北农林科技大学学报, **30** (2): 43－47.]

Prather RS, Boquest AC, Day BN. 1999. Cell cycle analysis of cultured porcine mammary cells [J]. *Cloning*, **1** (1): 17－24.

Shiels PG, Kind AJ, Campbell KHS, Waddington D, Wilmut I, Colman A, Schnieke AE. 1999. Analysis of telomere lengths in cloned sheep [J]. *Nature*, **399**: 316－317.

Wilmut I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. *Nature*, **385**: 810－813.

Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, Schernthaner W, Prelle K, Steinborn R, Muller M, Brem G, Wolf E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **115** (2): 325－331.